

ヒツジへの給与飼料の相違により誘起される成長ホルモン, グレリンおよびインスリンの分泌動態およびその制御機構

著者	高橋 辰行
号	45
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	農博第952号
URL	http://hdl.handle.net/10097/60136

たかはし たつゆき

氏名（本籍地） 高 橋 辰 行

学 位 の 種 類 博士（農学）

学 位 記 番 号 農博第 952 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 21 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項

研 究 科 ， 専 攻 東北大学大学院（博士課程）農学研究科資源生物科学専攻

論 文 題 目 ヒツジへの給与飼料の相違により誘起される成長ホルモン，グレリンおよび
インスリンの分泌動態およびその制御機構

博士論文審査委員 （主査）教 授 加 藤 和 雄

教 授 鈴 木 啓 一

教 授 駒 井 三千夫

論文内容要旨

緒言

反芻動物はその消化管構造が、単胃動物と大きく異なり、複胃を有している。その複胃、特に第一・二胃には微生物が多く共生しており、微生物の持つ酵素によって反芻動物が消化吸収できないセルロースやヘミセルロースを揮発性脂肪酸(VFA)に分解し、エネルギー基質としている。この VFA は、摂取する飼料や栄養素で発酵パターンが大きく変動するために、濃度も変化することが分かっている。また、VFA は成長ホルモン(GH)分泌を抑制し、インスリン分泌を刺激することが報告されている。さらに、栄養素や生体のエネルギーバランスによっても GH を始めとする内分泌動態は影響を受けることが明らかとなっている。つまり、摂取する飼料中の栄養素の相違は、第一胃内の発酵や内分泌動態に著しく影響を与え、個体の成長や生産性を把握する上で重要な要因となる。

1999 年に、これまでリガンドが不明であったオーファン受容体の一つである、成長ホルモン分泌促進因子受容体(GHS-R)のリガンドとしてラットの胃からグレリンが発見された。グレリンは成長ホルモン(GH)分泌を刺激し、摂食調節、エネルギー代謝およびインスリン分泌においても重要な役割を果たしていることが明らかにされた。特にこれまで成長ホルモンは視床下部から放出される成長ホルモン放出ホルモン(GHRH)およびソマトスタチン(SRIF)によって主に調節されると考えられていたが、グレリンの発見によって末梢組織からの調節についても考慮する必要性が出てきた。すなわち、消化吸収やエネルギー代謝の調節において、消化管への栄養素の流入によって誘導される消化管ホルモン分泌が重要な役割を担っているのである。したがって、家畜生産において最も重要なホルモンの一つである GH が、消化管ホルモンであるグレリンと密接な関係があり、エネルギー代謝の中核的役割を果たすインスリンとともに、これらのホルモンの分泌調節機構および関連性を明らかにすることが重要である。さらに、GH やインスリン分泌は栄養素によっても影響を受けることから、グレリンもまた栄養素によって影響を受けることが考えられるが、その詳細については未だ報告されていない。

そこで本研究では、GH、グレリンおよびインスリン分泌の制御機構が栄養素によってどのように調節されるかを検討することを目的とした。

研究 1.

濃厚飼料あるいは粗飼料多給時のヒツジにおけるルーメン発酵と内分泌の日内変動

給与する濃厚飼料の比率によってヒツジの血中 GH、インスリン、IGF-I 濃度が変化することが明らかとなっている。しかしながら、前述したように、これまで GH 分泌を制御するホルモンは GHRH および SRIF が主要な調節因子と考えられていたが、胃から分泌されるグレリンの発見によりグレリンも考慮する必要性が出てきた。また、反芻動物における採食行動や飼料組成の変化に伴う血中 GH やグレリン濃度変化は不明な部分が多い。

そこで研究 1 では、ルーメンフィステルを装着した去勢成ヒツジを用いて、採食に伴う血中ホルモン濃度および第一胃内溶液組成に及ぼす飼料組成の影響を検討した。実験では、総消化養分量(TDN)および粗タンパク質量(CP)を一定にした濃厚飼料多給区(C 区)および粗飼料多給区(R 区)の二区を設けた。一日一回給与し、二週間馴致した後、第一胃内溶液および頸静脈血を 24 時間にわたって経時的に採取し、VFA およびホルモン濃度をそれぞれ測定した。

採食後の第一胃内の総 VFA 濃度は両区ともに有意に上昇したが、両区間で有意な差は認められなかった。また、プロピオン酸濃度は、両区とも採食後に有意に上昇し、3 時間後の C 区における濃度は R 区よりも有意に高かった(Fig.1a)。酢酸濃度も両区とも採食後上昇し、採食 24 時間後の濃度は R 区の方が C 区よりも有意に高かった。さらに酪酸濃度においても、採食後両区とも上昇した。飼料区間においては有意な差は認められなかったが、C 区は R 区よりも採食後高い濃度を維持した。

血漿中 GH 濃度は両区ともに採食後に低下した。C 区における GH 濃度は、R 区よりも持続的に低下したが、有意な差は認められなかった。しかしながら、血漿中 GH 濃度の曲線下面積(AUC)においては、C 区の方が R 区よりも有意に低かった(Fig.1b)。C 区の血漿中グレリン濃度は採食前に高く、両区ともに採食後に低下した。C 区におけるグレリン濃度は、採食 45 分後に R 区よりも有意に低くなっていたが(Fig.1c)、AUC および incremental area (ICA ; 採食後の変化量)は両区間で有意な差は認められなかった。次に採食前のグレリン濃度の平均値を 100 %とし、採食後の変化率を比較した。その結果、C 区の採食後のグレリン濃度の低下がより明らかとなった

(Fig.1d)。さらに、グレリンは GH 分泌作用を有していることから、血漿中グレリンと GH 濃度の経時的变化を検討した。その結果、C 区におけるグレリンと GH 濃度の変動パターンはほぼ同一の変動パターンを示したが、R 区におけるパターンには乖離が認められた(Fig.1e)。血漿中インスリン濃度は採食後、両区ともに有意に上昇し、C 区の濃度が R 区よりも高くなる傾向を示したが、有意な差ではなかった。インスリンの AUC においても有意な差は認められなかったが、ICA においては C 区が R 区よりも有意に高かった(Fig.1f)。血漿中グルコース濃度においては、両区とも採食後にやや低下したが、飼料区間では有意な差は認められなかった(Fig.1g)。

以上の結果から、TDN や CP が同じでも組成が異なる飼料を二週間給与することによって、第一胃内発酵や GH、グレリンおよびインスリンなどの内分泌に差が生じることが明らかとなった。また、C 区においてグレリンと GH 濃度変動は類似していたが、R 区においてはグレリンと GH 濃度の経時的变化は異なっていた。これらの結果から、採食に伴う GH 分泌変動へのグレリンの関与は小さい可能性が示唆された。

研究 2.

高タンパク質飼料あるいは低タンパク質飼料給与時のヒツジにおける血中ホルモンの日内変動

飼料中 TDN および CP を一定にしたにもかかわらず、濃厚飼料、つまり易発酵性炭水化物によって血漿中ホルモンの分泌パターンが変化することが明らかとなった。反芻動物にとって炭水化物の摂取も重要であるが、それと同様にタンパク質の摂取も生体の成長および維持において重要である。以上のことを踏まえ、次に CP 量を変化させたときの血中ホルモンの分泌動態について検討した。

研究 2.では、去勢成ヒツジを用いて、高タンパク質あるいは低タンパク質飼料給与による血中ホルモン濃度への影響を検討した。実験では、TDN を一定にした高タンパク質飼料区(HP 区)および低タンパク質飼料区(LP 区)の二区を設けた。一日一回給与し、二週間の馴致の後、24 時間にわたって経時的に採血を行い、血漿中ホルモン濃度を測定した。

採食後、血漿中 GH 濃度は両区ともに低下した。HP 区における GH 濃度は LP 区よりも低下

していたが、有意な差は認められなかった。また AUC および ICA においても有意な差は認められなかった(Fig.2a)。血漿中グレリン濃度は両区ともに採食前に高く、採食後に低下した。採食前におけるグレリン濃度は HP 区の方が有意に高く、また採食後においても有意に高い値を維持していた。HP 区における AUC は LP 区よりも有意に大きく、逆に ICA は低くなる傾向を示した(Fig.2b)。次に採食前の血漿中グレリン濃度の平均値を 100 %とし、採食後の変化率を比較した。その結果、HP 区の採食前の基礎値までの回復が LP 区よりも遅くなることがより明らかとなった(Fig.2c)。採食前における血漿中インスリン濃度は飼料間で有意な差は認められなかったが、採食後、両区ともに有意に上昇し、HP 区が LP 区よりも有意に高かった。さらに、HP 区における AUC は LP 区よりも有意に高かった(Fig.2d)が、ICA においては有意な差は認められなかった。血漿中グルコース濃度は、採食開始 2,3 時間後にかけて、HP 区の濃度が C 区よりも有意に高くなっていた(Fig.2e)。

以上の結果から、CP 量が異なる飼料を二週間給与することは、血中 GH、グレリンおよびインスリン濃度を変化させることが明らかになった。また、研究 1.の結果と同様に、グレリンと GH 濃度は平行に変動せず、グレリンは採食に伴う GH 濃度変動に大きくは関与しない可能性が示唆された。

研究 3.

組織中グレリン濃度に及ぼす高タンパク質飼料あるいは低タンパク質飼料給与の影響

研究 1.および研究 2.の結果から、飼料組成によって血中ホルモンは変動することが明らかとなった。特に、タンパク質摂取の増加はグレリンとインスリン分泌を著しく増加させた。タンパク質によるグレリン分泌応答に関する報告はヒトやラットにおいて幾つか報告されているが矛盾しており、また反芻動物においては未だ報告がされていない。そこで研究 3.では飼料中タンパク質量の違いが組織中グレリン濃度に及ぼす影響について検討した。

実験は、研究 2.と同様に 2 区(HP 区と LP 区)を設けた。二週間の馴致後、採食前に採血を行い、翌日組織を採取した。

まず、血中ホルモン濃度を解析した結果、研究 2.と同様に、HP 区のグレリン濃度が LP 区よりも有意に高かった。しかし、GH およびインスリンにおいては有意な差は認められなかった (Fig.3a)。次に組織中に存在するグレリン濃度を解析した結果、第四胃(胃底部)で最も高く、次に十二指腸、第四胃(幽門部)、膵臓の順であった。胃底部におけるグレリン濃度においては、HP 区の濃度が LP 区よりも 10 倍以上高かった。また、膵臓における HP 区のグレリン濃度も LP 区よりも有意に高かった (Fig.3b)。

以上の結果から、高タンパク質飼料摂取によって誘発される血漿中グレリン濃度上昇は、組織中のグレリン生成と分泌の増大による可能性が示された。

研究 4.

血中あるいは第四胃へのアミノ酸投与による成長ホルモンおよびグレリン濃度の変化

血中グレリン濃度上昇がタンパク質摂取によって誘導されたことから、アミノ酸投与によっても誘導される可能性が考えられる。研究 4.では、アミノ酸投与によってグレリン分泌が変化するかどうかを検討した。

実験では頸静脈内注入区および第四胃内注入区を設けた。注入アミノ酸はグルタミン酸、アスパラギン酸、アルギニン、リジンとした。頸静脈内に 0.1 mmol/kg/min の濃度で 30 分間注入し、第四胃内には 0.1 mmol/kg/min の濃度で 60 分間注入した。

血中に注入した場合、GH 濃度はアスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン注入によって著しく上昇した (Fig.4a)。しかし、血漿中グレリン濃度は変化しなかった (Fig.4b)。

一方、第四胃内注入では GH 濃度は変化しなかった (Fig.5a) が、グレリン濃度はグルタミン酸、アスパラギン酸、アルギニン注入によって有意に上昇した (Fig.5b-e)。特にグルタミン酸注入時の AUC はコントロールと比べ有意に高くなった (Fig.5d)。

以上の結果から、第四胃内へのアミノ酸投与によって血漿中グレリン濃度が上昇することが明らかとなり、高タンパク質飼料給与による血漿中グレリン濃度上昇は第四胃およびそれ以降の腸管内アミノ酸濃度上昇による可能性が示された。

研究 5.

GHS 受容体あるいは GHRH 受容体の antagonist が及ぼすホルモン濃度の影響

研究 2.および 3.の結果から、飼料中のタンパク質量の増加によって血漿中グレリン濃度は有意に上昇したが、GH 濃度は変化していなかった。この結果から、飼料組成によって GH の分泌調節機構が変化することが考えられる。そこで研究 5.では、成長ホルモン放出ホルモン(GHRH)とグレリン受容体(GHS-R)の antagonist を用いて、高タンパク質飼料あるいは低タンパク質給与時におけるホルモン濃度調節機構を検討した。

実験は、HP+Saline, HP + GHS-R antagonist, HP+GHRH-R antagonist, LP+Saline, LP + GHS-R antagonist および LP+GHRH-R antagonist の 6 区を設定した。投与濃度は GHS-R antagonist の場合は 100 nmol/kg, GHRH-R antagonist の場合は 12 nmol/kg で行った。また両 antagonists は採食 10 分前に投与し、GHS-R antagonist のみ投与 30 分後に再度投与した。

HP 区における血漿中 GH 濃度は GHRH-R の antagonist 投与によって有意に上昇した。一方、GHS-R antagonist の投与後に GH 濃度は低下する傾向を示し、投与 70 分後において Saline 注入区との間に有意差が認められた。しかし、AUC および ICA 間にも有意差は認められなかった (Fig.6a)。LP 区における GH 濃度も、GHRH-R の antagonist 投与によって有意に上昇した。また、HP 区と同様に GHS-R の antagonist 投与によって GH の濃度は低下する傾向を示したが、有意差は認められなかった (Fig.6b)。血漿中グレリン濃度は、いずれの antagonist を投与しても HP 区および LP 区ともに有意差は認められなかった (Fig.6c,d)。一方、HP 区における血漿中インスリン濃度は GHS-R および GHRH-R の antagonist 投与によって、有意に上昇した (Fig.6e)。しかし、LP 区においては有意な差は認められなかった (Fig.6f)。また HP 区および LP 区ともに AUC および ICA には有意差は認められなかった。HP 区における血漿中グルコース濃度は採食後すべての区において上昇したが、有意な差は認められなかった (Fig.6g)。LP 区においても血漿中グルコース濃度は採食後やや上昇したが、有意な差認められなかった (Fig.6h)。

以上の結果から、HP および LP の両区において、採食後の GH 分泌低下に、グレリンが幾らか関与している可能性はあるものの、主要な調節因子ではないことが明らかとなった。むしろ、

グレリンは採食後のインスリン分泌に対し抑制的に作用していることが明らかとなった。一方、GHRH による GH の分泌調節は、GHRH-R antagonist 投与で分泌が刺激されたことから、詳細は明らかにできなかった。

総括

本研究では、ヒツジにおける飼料組成の相違が GH、グレリンおよびインスリンの分泌動態に及ぼす影響とその制御機構について検討した。

1. 濃厚飼料(C)あるいは粗飼料多給時(R)における血中ホルモンの変動

飼料中の TDN および CP が一定であるにも関わらず、血中 GH、グレリンおよびインスリン分泌は変化し、また採食後のグレリン濃度は C 区の方が R 区よりも著しく低下していた。VFA、特に酪酸およびプロピオン酸の血中あるいは第一胃内投与はインスリン分泌を刺激し、また GHRH で刺激した GH 分泌を抑制することが明らかとなっている。したがって、二週間にわたって濃厚飼料を多給することにより、第一胃内の発酵パターンが変化し、プロピオン酸や酪酸の生成濃度が上昇したことによって GH、グレリンおよびインスリン分泌に差が生じたことが考えられる。

2. 高タンパク質(HP)あるいは低タンパク質飼料(LP)による血中ホルモンおよび組織中グレリン濃度の変動

高タンパク質飼料給与によってグレリンおよびインスリン濃度は上昇し、組織中においてもグレリン濃度は著しく上昇していた。血中に存在するグレリンの約 60%は胃で合成・分泌されたものであることが報告されていることから、高タンパク質飼料摂取による血中グレリン濃度の上昇は、二週間にわたって高タンパク質飼料を摂取し続けることによって第四胃でのグレリン合成と分泌が増大した結果と考えられる。

3. 血中あるいは第四胃内へのアミノ酸注入によるグレリンと GH の分泌調節

血中へのアミノ酸注入において、グレリン濃度に有意な変化は認められなかった。しかし、第四胃内へのアミノ酸注入ではグレリン濃度は有意に上昇していた。この結果から、末梢のグレリン分泌機構においては胃が栄養素を認識することが重要であることを示唆している。一方、

GH 分泌は血中投与で上昇はしていたが、第四胃内投与では変化していなかった。この結果から、グレリンと GH 分泌は異なる調節機構によって制御されている可能性が考えられる。

4. グレリン受容体あるいは GHRH 受容体の antagonist 投与による GH およびインスリンの分泌調節機構

グレリン受容体の antagonist 投与では高タンパク飼料給与でやや GH 分泌は低下するものの、両飼料区とも有意な差は認められなかった。この結果から、採食時におけるグレリン分泌低下は GH 分泌低下に関与していないことが示唆された。一方、インスリン分泌においては高タンパク質飼料給与時ではグレリン受容体の antagonist 投与によって上昇していた。ラットの膵島において、グレリンはグルコースで誘導したインスリン分泌を抑制させることが示されている。また、ヒツジにおいても、グルコースで誘導したインスリン分泌をグレリンは低下させることが報告されている。これらの結果から、高タンパク質飼料を二週間摂取することは血中グレリン濃度を増大させ、さらにインスリン分泌の抑制効果も増大させることが明らかとなった。

本研究結果により、飼料中の TDN が一定であるにもかかわらず、組成が異なる飼料を二週間摂取し続けることによって、GH、グレリンおよびインスリンの分泌動態は変化することが明らかとなった。また、採食時におけるグレリン濃度の変動は GH 濃度変動と一致するとは限らず、GHS-R antagonist 投与によっても GH 分泌はほとんど変化しないことから、採食後の血中 GH 濃度低下にグレリンは関与しないことが示唆された。さらに、飼料中のタンパク質含量は、血中グレリン濃度を変化させるだけではなく、インスリン分泌におけるグレリンの抑制効果にも影響を及ぼすことが明らかとなった。

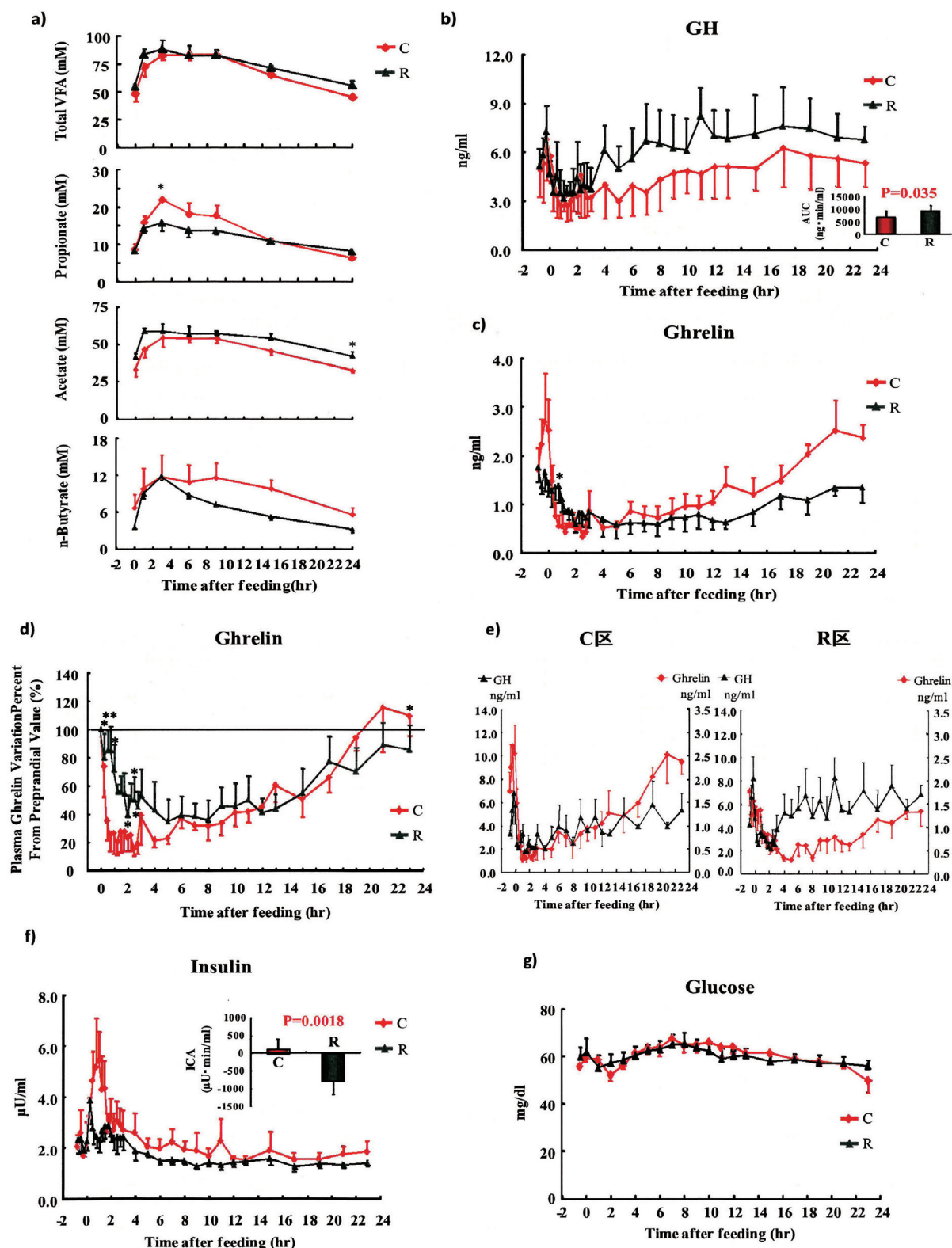


Fig.1 濃厚飼料あるいは粗飼料が及ぼすルーメン内パラメーターおよび血中ホルモンとグルコースの濃度変化(n=4)。(a)total VFA およびプロピオン酸、酢酸、酪酸濃度の変動(◆: C, ▲: R)。(b)血漿中成長ホルモン(GH)濃度変化およびAUC。(c)と(d)グレリン濃度変化および変化率。(e)各飼料区におけるGHとグレリンの変化(◆: グレリン, ▲: GH)。(f)各飼料区におけるインスリン濃度変化およびICA。(g)血漿中グルコース濃度変化。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (いずれも C vs R)。

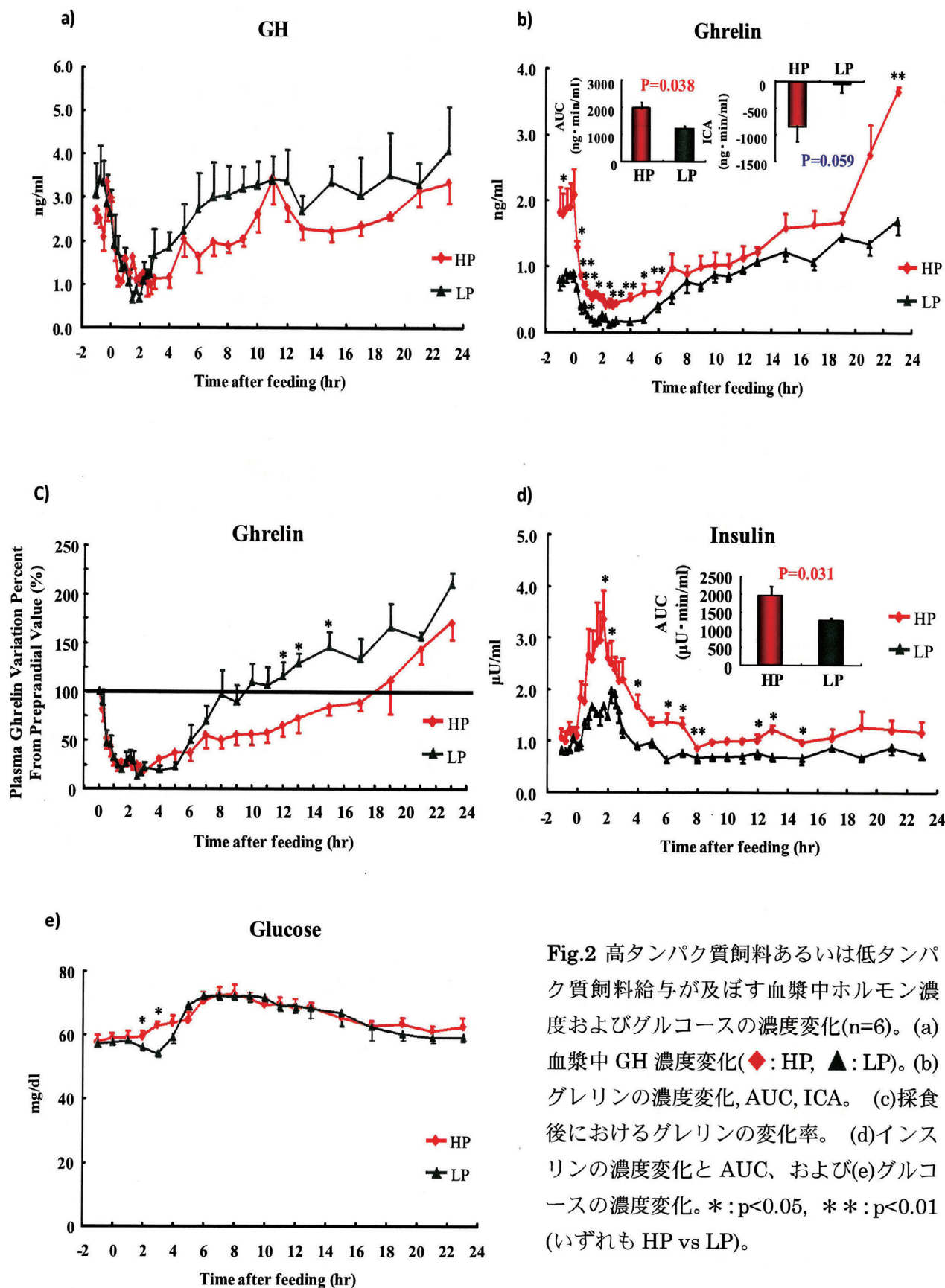


Fig.2 高タンパク質飼料あるいは低タンパク質飼料給与が及ぼす血漿中ホルモン濃度およびグルコースの濃度変化(n=6)。(a) 血漿中 GH 濃度変化(◆: HP, ▲: LP)。(b) グレリンの濃度変化, AUC, ICA。(c)採食後におけるグレリンの変化率。(d)インスリンの濃度変化と AUC、および(e)グルコースの濃度変化。*: $p<0.05$, **: $p<0.01$ (いずれも HP vs LP)。

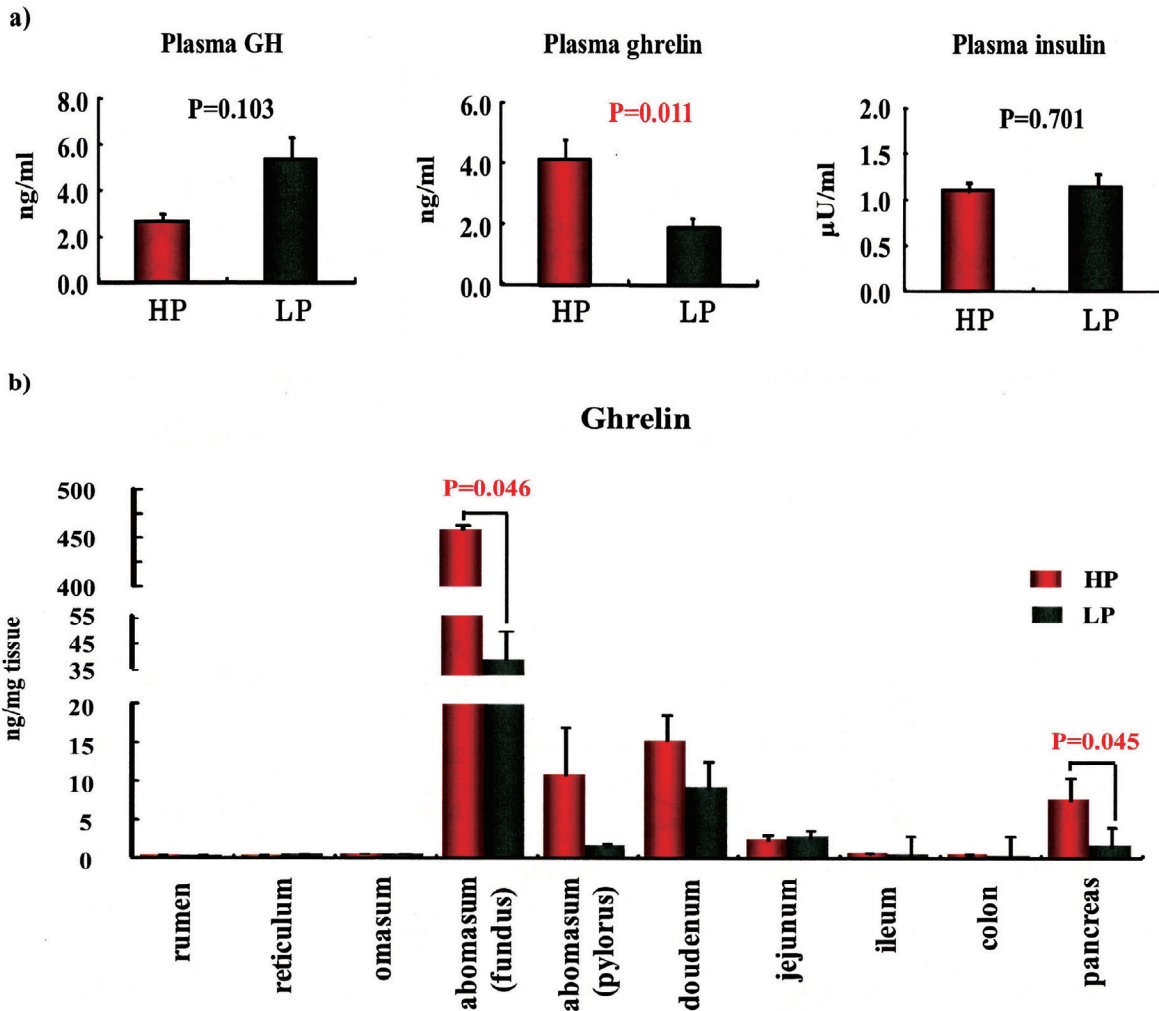


Fig.3 高タンパク質飼料あるいは低タンパク質飼料給与時の血漿中の GH, グレリンおよびインスリン濃度(a), および各組織におけるグレリン濃度(■: HP, ■: LP) (b)。*: $p<0.05$, **: $p<0.01$ (いずれも HP vs LP)。

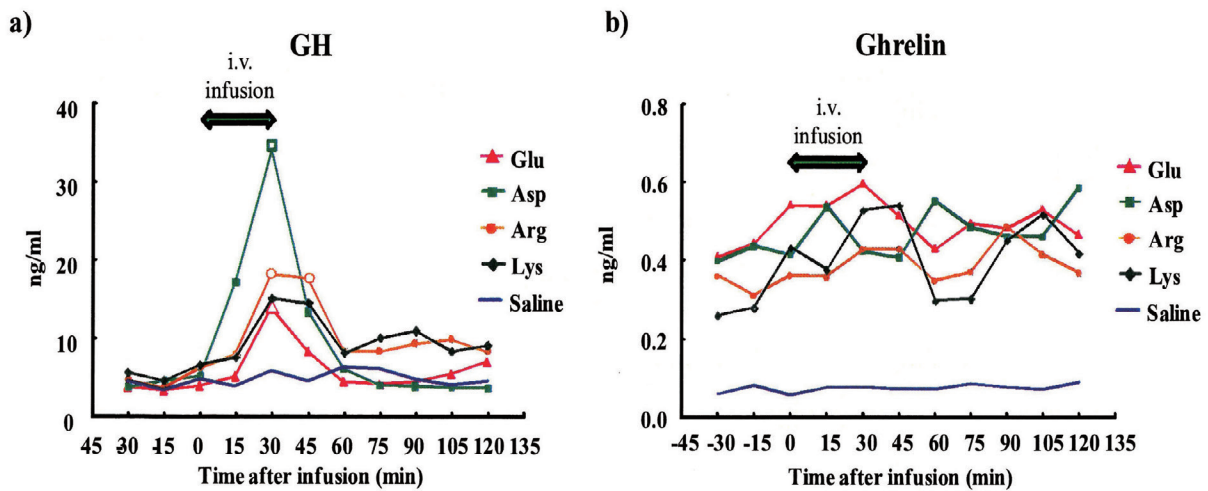


Fig.4 血中へのアミノ酸注入による血漿中 GH(a)およびグレリン濃度(b)の変化($n=6$) (▲: Glu, ■: Asp, ●: Arg, ◆: Lys, —: Saline)。白抜きは baseline に対する有意な上昇を示す($p<0.05$)。

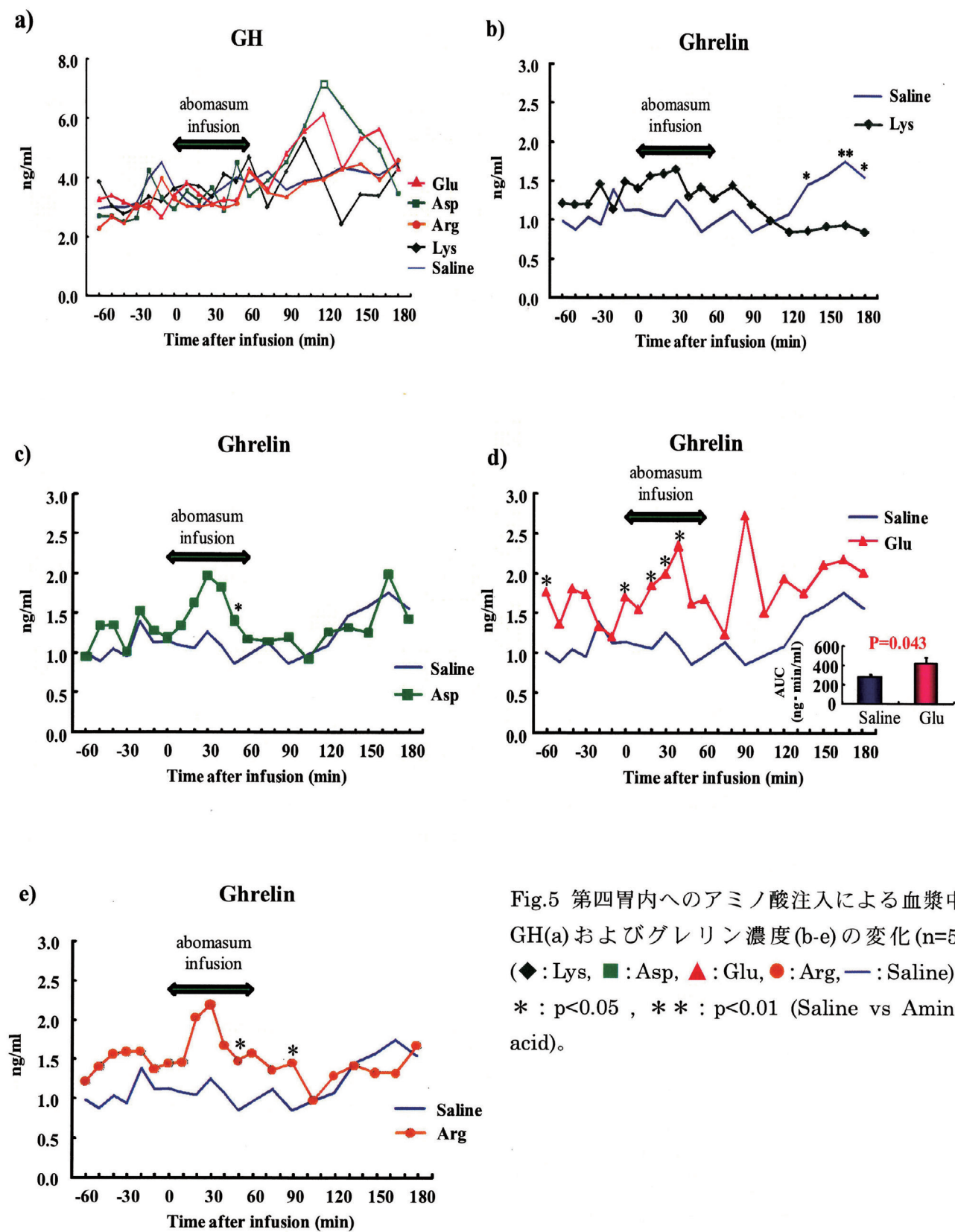
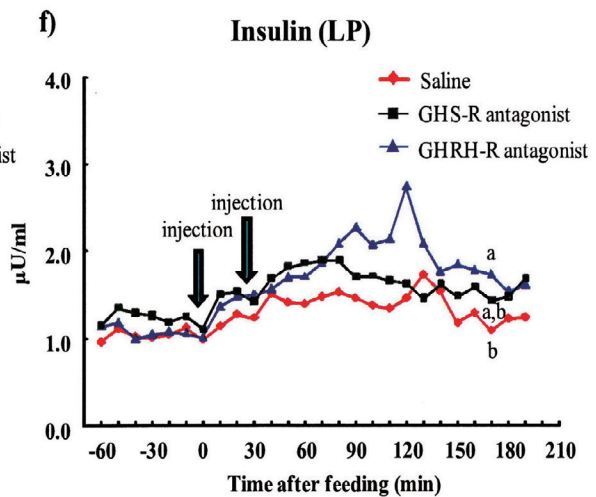
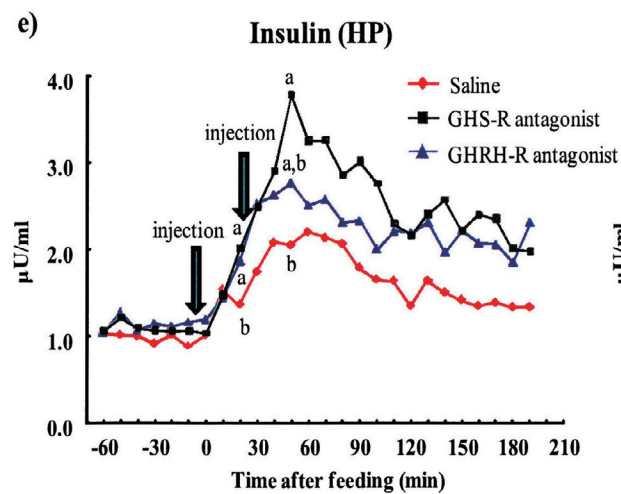
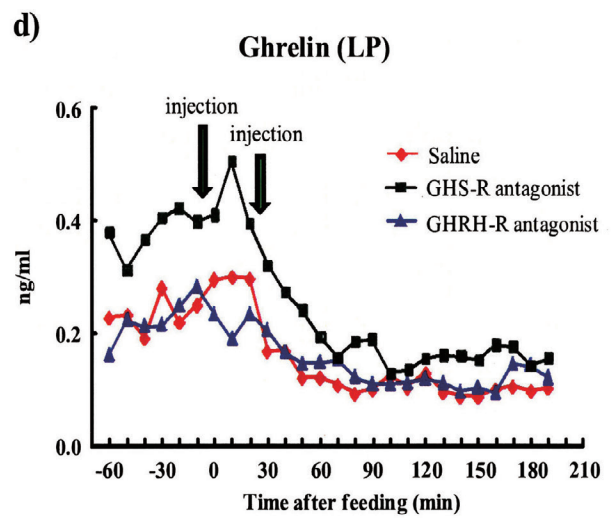
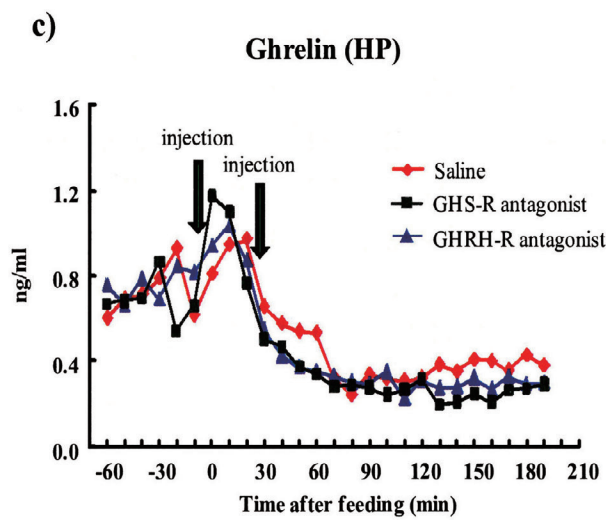
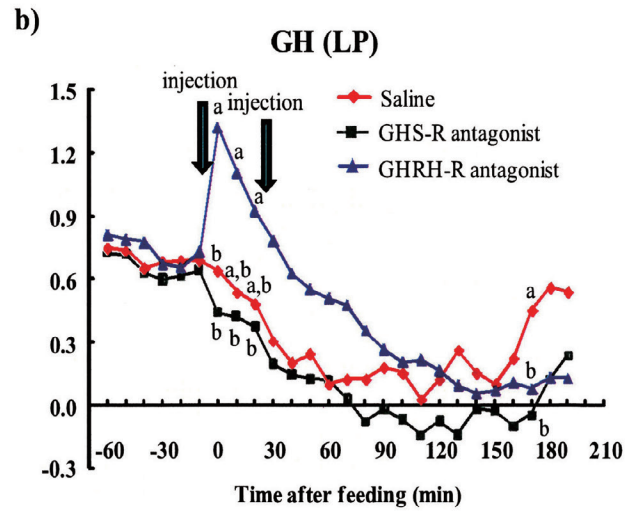
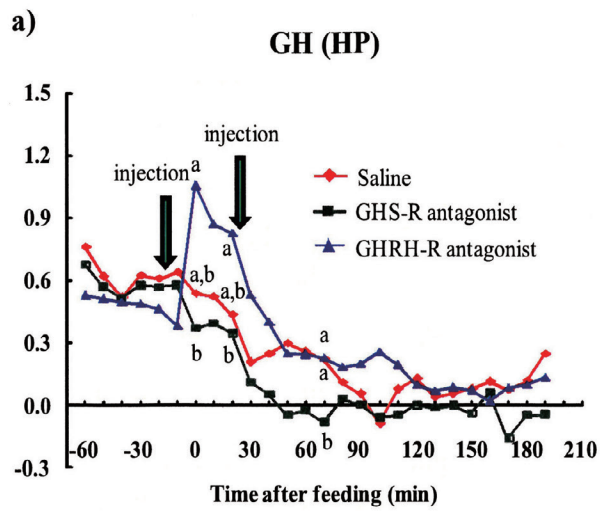


Fig.5 第四胃内へのアミノ酸注入による血漿中 GH(a) およびグレリン濃度(b-e) の変化 (n=5) (◆: Lys, ■: Asp, ▲: Glu, ●: Arg, —: Saline)。* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$ (Saline vs Amino acid)。



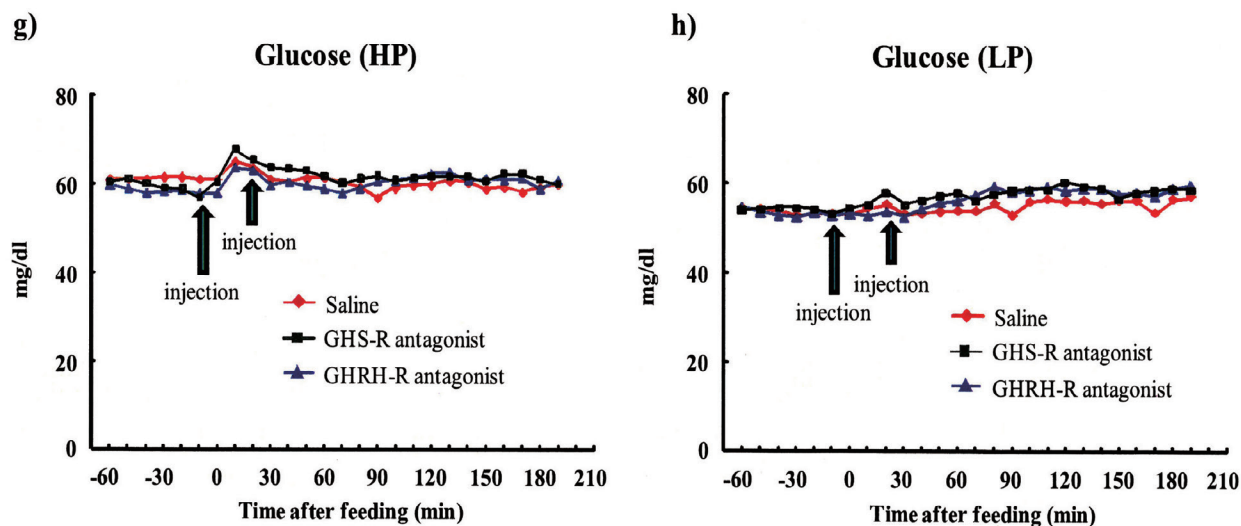


Fig.6 高タンパク質飼料給与区における GHS-R (100 nmol/kg), GHRH-R (12 nmol/kg), Saline 投与による GH の分泌動態 (n=5)。 (a) (◆: Saline, ■: GHS-R antagonist, ▲: GHRH-R antagonist)。低タンパク質飼料給与区における GHS-R (100 nmol/kg), GHRH-R (12 nmol/kg), Saline 投与による GH の分泌動態 (b)。高タンパク質飼料給与区におけるグレリンの分泌動態 (c)。低タンパク質飼料給与区におけるインスリンの分泌動態 (d)。高タンパク質飼料給与区におけるインスリンの分泌動態 (e)。低タンパク質飼料給与区におけるインスリンの分泌動態 (f)。高タンパク質飼料給与区におけるグルコースの分泌動態 (g)。低タンパク質飼料給与区におけるグルコースの分泌動態 (h)異なる文字は有意差($p<0.05$)があることを示す。

論文審査結果要旨

反芻動物における内分泌機能調節は、前胃での発酵があるために複雑である。最近になって、新規なホルモン（グレリン）が胃から分泌され、下垂体からの成長ホルモン（GH）分泌や膵内分泌腺からのインスリン分泌および採食機能などを調節することが明らかとなってきたが、その詳細は不明である。本研究では、反芻動物であるヒツジを用いて、グレリンの GH やインスリン分泌調節機構を明らかにするために、飼料組成を変化させ、採食させた時のホルモン動態を中心に、解明することを目的とした。

著者は、実験 1 において、濃厚飼料あるいは粗飼料を給与した時に、血中のグレリンと GH 濃度が有意に低下するが、両者の経時的変化は粗飼料給与時に一致しないことを発見した。実験 2 において、高タンパク質あるいは低タンパク質飼料を給与した時に、血中グレリン濃度が有意に変化することを発見した。飼料中タンパク質含量の変化で血中グレリン濃度が変化するという報告は反芻動物では見られない。実験 3 では、アミノ酸を血中あるいは第四胃に注入し、第四胃へのアミノ酸注入が血中グレリン濃度を有意に増大することを発見し、第四胃以降の胃腸管がアミノ酸を感受しグレリン分泌に連なる経路が存在する可能性を示した。また、第四胃組織中のグレリン含量が他の組織より有意に高く、高タンパク質飼料給与が含量を有意に増大することから、飼料組成の変化は第四胃組織中のグレリン生成を変化する可能性を示した。実験 4 では、採食時のホルモン濃度変化に、グレリンや GHRH がどのように関連するのか、また、飼料中タンパク質の変化がホルモン分泌調節をどのように変化させるのかを検討するために、グレリンあるいは GHRH 受容体の遮断薬を用いて検討した。その結果、採食に伴う血中 GH 濃度の低下にグレリンはほとんど関与しないが、採食に伴うインスリン濃度増加に関しては、グレリン遮断薬が促進的に作用することを発見した。一方、血中グルコース濃度には、遮断薬の効果は認められなかった。

以上のように、反芻動物における GH やインスリン分泌調節機構は、飼料中化学組成の変化に伴って変化し、新規なホルモンであるグレリンは GH よりもインスリン分泌調節に大きく関与することが明らかにされた。よって、審査員一同は、本論文の著者が博士（農学）の学位を授与されるのに値するものと判定した。